



* B R 1 0 2 0 2 2 0 2 4 1 6 9 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022024169-4 A2

(22) Data do Depósito: 26/11/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
11/06/2024

(54) **Título:** PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO E COM TEMPO REDUZIDO UTILIZANDO ÓLEO MINERAL

(51) **Int. Cl.:** G01N 1/00.

(52) **CPC:** G01N 1/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** SILVANIA TAVARES PAZ; PALOMA LYS DE MEDEIROS.

(57) **Resumo:** PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO E COM TEMPO REDUZIDO UTILIZANDO ÓLEO MINERAL. A produção diária de um Laboratório de Histotecnologia está voltada para o processamento de tecidos do organismo (humano ou animal) e até mesmo de amostras de plantas (folhas, caule ou raízes), usualmente corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) ou com outras técnicas de colorações especiais. Nos dias atuais, a realização do processamento histológico de rotina ainda expõe os técnicos e pesquisadores da área, a um produto tóxico e bastante conhecido, o Xilol. Devido à toxicidade inerente ao xilol, com riscos para a saúde humana e ao meio ambiente, modificações metodológicas vêm sendo realizadas mundialmente para a retirada desse produto ou para minimizar ao máximo a sua utilização na rotina dos Laboratórios de Histotécnica. A busca por um substituto seguro continua sendo uma necessidade diária, especialmente para a biosseguridade do histotecnologista. No presente processo inventivo propõe-se um processo histológico atóxico e com tempo reduzido utilizando óleo mineral para a rotina de laboratórios de histotécnica das áreas de ensino, pesquisa e diagnóstico.

PROCESSAMENTO DE TECIDOS HISTOLÓGICOS			
ETAPA DE PRÉ-FIXAÇÃO			
XILOL	Tempo	ÓLEO MINERAL	Tempo
Formol tamponado (10%)	24 h	Formol tamponado (10%)	24 h
Água corrente	30 seg	Água corrente	30 seg
ETAPA DE FIXAÇÃO PROPRIAMENTE DITA			
XILOL	Tempo	ÓLEO MINERAL	Tempo
Alcool 70%	24 h	Alcool 70%	24 h
Alcool 80%	1h	Alcool 80%	30 min (estufa 50°C)
Alcool 90%	1h	Alcool 90%	30 min (estufa 50°C)
Alcool 100%	1h	Alcool 100%	30 min (estufa 50°C)
Alcool 100%	1h	Alcool 100%	30 min (estufa 50°C)
Alcool-xilol	1h	Óleo mineral I	30 min (estufa 50°C)
Xilol I	1h	Óleo mineral II	30 min (estufa 50°C)
Xilol II	1h	Parafina I	30 min (estufa 60°C)
Parafina I	1h	Parafina II	30 min (estufa 60°C)
Parafina II	1h	-----	-----
Tempo total do processo:	57 horas e 30 segundos	Tempo total do processo:	52 horas e 30 segundos

Figura 1

PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO E COM TEMPO REDUZIDO UTILIZANDO ÓLEO MINERAL

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se à implantação de um processo histológico atóxico e com tempo reduzido utilizando óleo mineral em substituição ao xilol, a ser incorporado na rotina dos laboratórios de técnicas histológicas voltados para o ensino, pesquisa e diagnóstico. O uso do óleo mineral como agente diafanizador no clareamento de tecidos e como desparafinizador para que se possa proceder as colorações histológicas, deverá proporcionar melhorias consideráveis ao ambiente e a saúde dos histotecnologistas que trabalham em setores vinculados às áreas das Ciências Biológicas e da Saúde.

Fundamentos da invenção

[002] Os efeitos do xilol foram considerados temíveis em 1970 e a partir dessa constatação muitos substitutos tornaram-se disponíveis, alguns até mais danosos que o referido solvente (BUESA; PESHKOV, 2009). O xilol é um hidrocarboneto aromático utilizado rotineiramente nos laboratórios de histopatologia, nas etapas de diafanização e desparafinização do processo histológico, assim como na montagem de preparações histológicas (COSTA et al., 2007; BUESA; PESHKOV, 2009; CHEN et al., 2010; NUNES; CINSA, 2016).

[003] Um dos grandes problemas para os técnicos de laboratórios das áreas morfológica e da patologia, envolve a questão de exposições repetidas ou excessivas ao xilol via inalação e ingestão de vapores, como também pelo contato direto através dos olhos e da pele (KUM et al. 2007). Os efeitos tóxicos do xilol são bem conhecidos e podem causar danos, alguns irreversíveis, especialmente para órgãos do sistema nervoso central e outros como pulmão, fígado, rins e pele (GAMBERALE, ANNWALL, HULTENGREN, 1978; HASS et al., 1995; JACOBSON; McLEAN, 2003; CHATTERJEE et al., 2005; COSTA et al., 2007; KERETETSE et al., 2008; SANDIKCI et al., 2009, KANDYALA et al., 2010; FUENTE et al., 2013).

[004] A Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (OSHA), uma agência do Departamento do Trabalho dos Estados Unidos dos Estados, identificou o xilol como um

produto químico de risco biológico e a partir dessa notificação muitas pesquisas enveredaram pela busca de um substituto não tóxico (PREMALATHA et al. 2013).

[005] Métodos livres de xilol para confecção de cortes histológicos equivalentes aos convencionais foram cogitados, mesmo levando em conta a alta toxicidade desse solvente para os seres humanos e possíveis danos ao meio ambiente (FALKEHOLM, 1996; BUESA, 2000; CHATTERJEE et al., 2005; BUESA, 2007; KUM et al., 2007; BUESA, 2009; SANDIKCI et al., 2009; ANKLE; JOSHI, 2011; PREMALATHA et al., 2013).

[006] Uma redução de custos com o uso e redistilação do isopropanol na etapa da desidratação e como alternativa para eliminar o xilol, foi relatada por alguns pesquisadores que obtiveram cortes histológicos de tecido mamário, intestino e pele, aparentemente com as mesmas características daqueles processados convencionalmente para diagnóstico (cerca de 74 %); entretanto, o referido método não foi capaz de atender completamente as expectativas dos avaliadores, devido a uma alteração na solução de van Gieson, o que propiciou a geração de artefatos no momento da análise dos tecidos (FALKEHOLM et al., 2001).

[007] Alguns agentes clareadores têm sido usualmente utilizados como: (a) tolueno e benzeno que apresentam propriedades similares ao xilol e são menos danosos para os tecidos em exposição prolongada, porém são extremamente tóxicos; (b) clorofórmio, de ação lenta, custo elevado e altamente inflamável; (c) óleo de Cedro, recomendado para tecidos delicados, porém com pouco efeito endurecedor, de ação lenta e custo elevado; (d) metil benzoato e metil salicilato considerados agentes clareadores lentos e que podem ser misturados (BANCROFT; GAMBLE, 2002; ALWAHAIBI et al., 2018).

[008] A utilização de álcool isopropílico durante a desidratação para substituir o etanol permitiu excluir o tratamento com solventes intermediários de parafina (clorofórmio, xilol e benzeno) e reduziu a compactação dos tecidos; no entanto, a qualidade dos resultados obtidos neste estudo apresentou-se dependente das propriedades da parafina utilizada (Paraplast®), com aumento do tempo de processamento e conseqüentemente acarretando uma maior exposição para o técnico (VIKTOROV; PROSHIN, 2003).

[009] O *n*-heptano(C₇), um hidrocarboneto alifático também conhecido como “gás branco”, foi proposto por alguns pesquisadores como substituto do xilol na diafanização; contudo, a mistura de hexano-heptano relativamente barata e não tão perigosa e tóxica como os solventes aromáticos ou clorados, não constituiu uma novidade por ter sido

anteriormente empregada como solvente na histopatologia e na histoquímica (STOCKERT et al., 2012).

[0010] Uma solução de óleo branco, composta por mistura de óleo branco nº 2 (86 %) e *n*-heptano (14 %), foi proposta como um possível substituto não-tóxico do xilol, visto não terem sido observadas quaisquer diferenças entre os blocos de parafina obtidos a partir do processamento com o xilol e com a referida mistura (KUNHUA et al., 2011). Neste estudo, os tecidos processados com a solução de óleo branco e corados com hematoxilina-eosina apresentaram morfologia celular preservada e os resultados foram comparados com outros obtidos a partir da histoquímica e da imuno-histoquímica (KUNHUA et al., 2011).

[0011] Alguns estudos demonstraram que o dióxido carbono supercrítico (scCO₂) por apresentar propriedades físicas tanto de gás como de líquido, caracterizou-se como um versátil “solvente” na substituição de etil acetato e diclorometano, o que fez com que essa tecnologia fosse bastante utilizada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos; logo, um protocolo com dióxido de carbono supercrítico foi desenvolvido e patenteado (WO 2005001437) para o processamento de tecidos na área da patologia (BECKEMAN, 2004; BLEUEL et al., 2008; BLEUEL et al., 2012).

[0012] Vários substitutos do xilol têm sido relatados na literatura e entre esse os óleos vegetais (cedro, oliva, coco, palma, pinho, dentre outros) têm se revelado como possíveis candidatos, especialmente como agentes clareadores; entretanto, por razões não referidas, alguns se apresentaram pouco efetivos no processamento de determinados tecidos histológicos quando comparados ao uso do xilol (SWAMY et al., 2015; DIGALA et al., 2017; RAVIDRAN et al., 2018; CHANDRAKER et al., 2019; SARAVANAKUMAR et al., 2019; ABREU et al 2022; THAJUDEEN, et al. 2022).

[0013] Além da exposição ocupacional, a contaminação do solo com o xilol tem sido um fator preocupante, podendo atingir águas superficiais ou subterrâneas, onde pode ficar por meses antes de se decompor em outros produtos químicos (PREMALATHA et al. 2013). Nos últimos anos o interesse mundial por “Tecnologias verdes” tem aumentado em função da utilização de produtos com menor impacto ambiental, e como parte da essência do “*Go green*”, tornou-se desafiador a busca por alternativas seguras e bioamigáveis aos produtos químicos tóxicos (YADAV et al., 2019; PREMA et al. 2020; OSHA, 2021).

[0014] Até hoje, o xilol continua sendo utilizado nos laboratórios de histotécnica, mesmo tendo-se o conhecimento que é um solvente muito perigoso, especialmente por produzir efeitos tóxicos como a carcinogênese, além de ser caro e difícil de descartar, comprometendo drasticamente o ambiente. Neste contexto, a presente invenção referente ao processo histológico atóxico e com tempo reduzido utilizando óleo mineral em substituição ao xilol, preconiza o uso do óleo mineral nas etapas da diafanização e desparafinização do processo histológico num tempo aproximado de 20 minutos, gerando benefícios como fácil e rápida exequibilidade, baixo custo e sobretudo biossegurança pessoal por ser atóxico, além de não prejudicar o meio ambiente.

Referências

[0015] ABREU, B.O.; MESSIAS, I.M.O; ARAÚJO, R.J.O.; FLORÊNCIO, M.S.; SILVA FILHO, J.F.; MESSIAS, J.B. (2022). Substituição do xilol por óleo de coco extravirgem na etapa de diafanização da rotina histológica. Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e5911124609, 2022. ISSN: 2525-3409. Doi: 10.33448/rsd-v11i1.24609

[0016] ALWAHAIBI, N.; ALJARADI, S.; ALAZRI, H. (2018). Alternative to xylene as a clearing agent in histopathology. Journal of Laboratory Physicians, v. 10, n. 2, p. 189-193. Doi: 10.4103/JLP.JLP_111_17. PMID: 29692586; PMCID: PMC5896187

[0017] ANKLE, M.R.; JOSHI, P.S. (2011). A study to evaluate the efficacy of xylene-free hematoxylin and eosin staining procedure as compared to the conventional hematoxylin and eosin staining: An experimental study. Journal of oral and maxillofacial pathology; v. 15; n. 2; p. 161-167. Doi:10.4103/0973-029x.84482

[0018] BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. (2002). Theory and Practice of Histological Techniques. 5th edition. Missouri: Harcourt Publishers; pp. 63-108.

[0019] BECKMAN, E.J. (2004). Supercritical and near critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. Journal of Supercritical Fluids; v. 28, n. 2-3; p. 121-191. Doi:10.1016/S0896-8446(03)00029-9

[0020] BLEUEL, E.; Van der VEGET, B.; SMITH, P.; HOFLAND, G.; KLUIN, P.M.; Den DUNNEN, W.F.A. (2008). Xylene free tissue processing: a novel approach using supercritical carbon dioxide. Histopathology, NJ USA: Wiley-Blackwell, v. 53, n. 1, p.116.

[0021] BLEUEL, E.P.; ROEBERS, T.P.; SCHULTING, E.; Den DUNNEN, W. F. (2012). Solvent-free tissue processing using supercritical carbon dioxide. *Histopathology*; v.61, n. 6; p. 1198-1208. Doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04342.x. PMID: 23171306.

[0022] BUESA, R. J. (2000). Mineral oil: the best xylene substitute for tissue processing yet? *Journal of Histotechnology*, v. 23, n. 2, p. 143-148. Doi:10.1179/014788800794813246

[0023] BUESA, R.J. (2007) Microwave-assisted tissue processing: real impact on histology workflow. *Annals of Diagnostic Pathology*; v. 11; n. 3; p. 206-211. ISSN 1092-9134. Doi:10.1016/j.anndiagpath.2007.02.006.

[0024] BUESA, R.J.; PESHKOV, M.V. (2009). Histology without xylene. *Annals of Diagnostic Pathology*; v. 13; n. 4; p. 246-56. Doi:10.1016/j.anndiagpath.2008.12.005. PMID: 19608083.

[0025] CHANDRAKER, R.; RATHOD, V.C.; CHANDRAKER, N.K., PUNDIR, S., DIXIT, S.; DESAI, V. (2019). Comparison between xylene and coconut oil in tissue processing. *Modern Medical Laboratory Journal*, v. 2, n. 1, p. 96-99. ISSN: 2371-770X

[0026] CHATTERJEE, A.; BABU, R.J.; AHAGHOTU, E.; SINGH, M. (2005). The effect of occlusive and un occlusive exposure to xylene and benzene on skin irritation and molecular responses in hairless rats. *Archives of Toxicology*; v. 79; n. 5; p. 294-301. Doi: 10.1007/s00204-004-0629-1. PMID: 15902427.

[0027] CHEN, C.Y.; HE, T.; MAO, X.L.; FRIIS, T. E.; QIN, R. H.; JIAN, Y. T. (2010). A novel xylene substitute for histotechnology and histochemistry. *Biotechnology & Histochemistry*; v. 85; n. 4; p. 231-240. Doi: 10.3109/10520290903235445. PMID: 20629612.

[0028] COSTA, K.N.S. da; PINHEIRO, I.O.; CALAZANS, G.T.; NASCIMENTO, M.S. do (2007). Avaliação dos riscos associados ao uso de xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*; v. 32, n. 116, p. 50-56. ISSN: 0303-7657.

[0029] DIGALA, P., BOLLU, D., KARTHICKA C., VINCY, S.J., SELVAM, R.; KANDASWAMY, S. (2017). Alternative to reduce occupational hazards for paramedical

staffs in Histopathology Department. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences, v. 12, n. 5. ver III, p. 05-12. Doi: 10.9790/3008-1205030512

[0030] FALKEHOLM, L. (1996). Going Green: Using water, not xylene (Letter). *Lab. Medecine*, v. 27, p. 638.

[0031] FALKEHOLM, L; GRANT, C. A; MAGNUSSON, A.; MÖLLER, E. (2001) Xylene-free method for histological preparation: a multicentre evaluation. *Laboratory Investigation*. v. 81, n. 9, p. 1213–1221. Doi: 10.1038/labinvest.3780335. PMID: 11555669.

[0032] FUENTE, A.; MCPHERSON, B.; CARDEMIL, F. (2013). Xylene-induced auditory dysfunction in humans. *Ear Hear*; v. 34; n. 5; p. 651-660. Doi: 10.1097/AUD.0b013e31828d27d7. PMID: 23598724.

[0033] GAMBERALE, F.; ANNWALL, G.; HULTENGREN M. (1978). Exposure to xylene and ethylbenzene. III. Effects on central nervous functions. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*; v. 4; n. 3; p. 204-211. Doi: 10.5271/sjweh.2705. PMID: 705287.

[0034] JACOBSON, G.A.; McLEAN, S. (2003) Biological monitoring of low level occupational xylene exposure and the role of recent exposure. *Annals of Occupational Hygiene*; v. 47; n. 4; p. 331-336. Doi: 10.1093/annhyg/meg045. PMID: 12765874.

[0035] KANDYALA, R.; RAGHAVENDRA, S.P.; RAJASEKHARAN, S.T. (2010). Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. *Journal of oral and maxillofacial pathology*; v. 14; n. 1; p. 1-5. Doi: 10.4103/0973-029X.64299. PMID: 21180450; PMCID: PMC2996004.

[0036] KERETETSE, G.S.; LAUBSCHER, P.J.; DU PLESSIS, J.L.; PRETORIUS, P.J.; Van der WESTHUIZEN, F.H.; Van DEVENTER, E.; Van DYK, E.; ELOFF, F.C.; Van AARDE, M.N.; DU PLESSIS, L.H. (2008). DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of african petrol attendants: a pilot study. *Annals of Occupational Hygiene*; v. 52; n. 7; p. 653-662. Doi: 10.1093/annhyg/men047. PMID: 18664513.

[0037] KUM, C.; KIRAL, F.; SEKKIN, S.; SEYREK, K.; BOYACIOGLU, M. (2007). Effects of xylene and formaldehyde inhalations on oxidative stress in adult and developing rats livers. *Experimental Animals*; v. 56, n. 1; p. 35-42. Doi: 10.1538/expanim.56.35. PMID: 17283889.

[0038] KUNHUA, W.; CHUMING, F.; TAO, L.; YANMEI, Y.; XIN, Y. XIAOMING, Z.; XUEZHONG, G.; XUN, L. (2011). A novel non-toxic xylene substitute (SBO) for histology. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines; v. 9, n. 1, p. 43 - 49. Doi: 10.4314/ajtcam.v9i1.6. PMID: 23983318; PMCID: PMC3746537.

[0039] NUNES, C.S.; CINSA, L.A. (2016). Princípios do processamento histológico de rotina. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v. 8, n. único, p. 31-40. Monografia. LILACS ID: biblio-964830

[0040] OSHA - Occupational safety and health administration (2021). Xylene, all isomers (dimethylbenzene). Available from: <https://www.osha.gov/chemicaldata> [last cited on 2021 Apr 06].

[0041] PREMA, V.; PRASAD, H.; SRICHINTHU, K.K.; KUMAR, S.S.; RAJKUMAR, K.; MARUDHAMANI, C. (2020). Biofriendly substitutes for xylene in deparaffinization. Journal of Pharmacy and Bioallied; v. 12, n. 1; p. S623-S630. Doi: 10.4103/jpbs.JPBS_164_20. PMID: 33149532; PMCID: PMC7595545.

[0042] PREMALATHA, B.R.; PATIL, S.; RAO, R.S.; INDU, M. (2013) Mineral oil – a biofriendly substitute for xylene in deparaffinization; a novel method. The Journal of Contemporary Dental Practice, v. 14, n. 2; p. 281-286. Doi: 10.5005/jp-journals-10024-1314. PMID: 23811660.

[0043] RAVINDRAN, R., SRUTHI, A.K., AMEENA, M.; HARISH, R.N.K.D. (2018). Bleached Palm Oil as a Bio-friendly Substitute for Xylene: A Comparative. Study. Oral and Maxillofacial Pathology Journal, v. 9, n. 2, p. 63-69. Doi: 10.5005. /jp-journals-10037-1132

[0044] SANDIKCI, M.; SEYREK, K.; AKSIT, H.; KOSE, H. (2009). Inhalation of formaldehyde and xylene induces apoptotic cell death in the lung tissue. Toxicology and Industrial Health, v. 24, n. 7; p. 455-461. Doi: 10.1177/0748233709106824. PMID: 19648215.

[0045] SARAVANAKUMAR, P.; BHARANIDHARAN, R.; RAMADOSS, R.; ARAVIND; KUMAR, A.R. (2019). Efficacy of “groundnut oil” and “coconut oil” as a substitute for “xylene” in clearing tissues samples - A comparative study. SRM Journal of Research in Dental Sciences, v. 10, n. 4, p. 194-196, 2020. Doi: 10.4103/srmjrds.srmjrds_53_19

[0046] STOCKERT, J.C.; LÓPEZ-ARIAS, B.; DEL CASTILLO, P.; ROMERO, A.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. (2012). Replacing xylene with n-heptane for paraffin embedding *Biotechnic & Histochemistry*, v. 87, n. 7, p. 464-467. Doi: 10.3109/10520295.2012.701764. PMID: 22853037.

[0047] SWAMY, S.K.R.G., NANDAN, S.R.K., KULKARNI, P.G., RAO, T.M.; PALAKURTHY, P. (2015). Bio-friendly alternatives for xylene - carrot oil, olive oil, pine oil, rose oil. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n. 11, p. ZC16-ZC18. Doi: 10.7860/JCDR/2015/16384.6731.

[0048] THAJUDEEN, A.; SRINIVASAN, S.; GOVINDARAJAN, G.; SHANMUGAM, A. (2022). A comparative study of efficacy of coconut oil, lemon water and dishwashing liquid as surrogates to xylene. *Environmental Analysis Health and Toxicology*, n. 37, n. 3, p. e2022026. Doi:10.5620/eaht.2022026

[0049] VIKTOROV, I.V; PROSHIN, S.S. (2003) Use of isopropyl alcohol in histological assays: dehydration of tissue, embedding into paraffin, and processing of paraffin sections. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*; v.136; n. 1; p. 105-106. Doi: 10.1023/a:1026017719668. PMID: 14534624.

[0050] YADAV, S.; MALLYA, V.; KHURANA, N. Xylene-free staining: Is it possible and practical? (2019) *Indian Journal of Pathologists and Microbiologists*, v. 62, n. 2. p. 274-278. Doi:10.4103/IJPM.IJPM_39_18

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 apresenta as etapas do processamento histológico como pré-fixação e a fixação propriamente dita realizadas com o xilol e o óleo mineral.

A Figura 2 apresenta a etapa de pós-fixação do processamento histológico (desparafinização, coloração e montagem) realizada com o xilol e o óleo mineral.

A Figura 3 representa o fluxograma do processamento de tecidos histológicos, com ênfase no processo atóxico e com tempo reduzido utilizando óleo mineral.

Descrição da invenção

[0051] O processo histológico atóxico e com tempo reduzido utilizando o óleo mineral foi desenvolvido no Laboratório de Histotécnica do Programa de Pós-graduação em

Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, o qual se encontra atualmente incorporado ao Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco. Para dar andamento ao processo histológico, diferentes órgãos de ratos Wistar (testículo, ovário, útero, intestino, fígado e baço) foram retirados, de acordo com aprovação da Comissão de Ética para uso de animais (CEUA) do Centro de Biociências da UFPE (processo nº. 0041/2016). Os órgãos foram seccionados em partes pequenas que foram imediatamente acondicionadas por 24 horas em recipientes contendo fixador (formol tamponado à 10%). Os recipientes foram rotulados com a data e hora da retirada de cada parte dos diferentes órgãos.

[0052] A etapa de pré-fixação dos órgãos (Figura 1), foi idêntica tanto para o processamento convencional (com uso do xilol), quanto para o processo atóxico (com uso do óleo mineral em substituição ao xilol). Os órgãos permaneceram por 24 horas no fixador (formol tamponado à 10%) e em seguida foram rapidamente lavados com água corrente (30 segundos) para serem utilizados na etapa fixação propriamente dita.

[0053] Na etapa de fixação propriamente dita (Figura 1), as amostras (partes de cada órgão), também, foram submetidas aos dois tipos de processamento histológico referidos anteriormente. Inicialmente, as amostras foram processadas pela técnica convencional (com uso do xilol) e passaram por banhos de álcool com gradações crescentes. Sendo assim, as amostras permaneceram por 24 horas em álcool a 70 % e em seguida, por uma hora em cada álcool: 80 %, 90 %, 100 % (I) e 100 % (II). Ao serem retiradas do último banho com álcool II (100 %), as amostras ainda passaram por um banho de uma hora, com uma mistura de solventes (álcool-xilol) e seguiram com banhos de xilol (I e II) também por uma hora cada, sendo diafanizadas, ou seja, clareadas. Após as passagens pelo xilol, as amostras foram impregnadas em parafina (I e II), uma hora para cada passagem. O tempo total para realização desse processo foi contabilizado em 57 horas e 30 segundos (Figura 3).

[0054] As amostras, também, foram submetidas ao processo histológico atóxico com uso do óleo mineral em substituição ao xilol (Figura 1) e passaram por banhos de álcool seguindo gradações crescentes: à 70 % (por 24 horas, temperatura ambiente) e à 80 %, 90 %, 100 % (I e II), por 30 minutos cada banho em estufa a 50°C. Posteriormente, as amostras foram colocadas em óleo mineral I (30 minutos, em estufa a 50°C) e a seguir passaram por mais uma imersão em óleo mineral II (30 minutos, em estufa a 50°C). Após

esse procedimento cada amostra foi colocada em recipiente específico com parafina I (30 minutos) e em seguida passada para outro recipiente com parafina II (30 minutos), sendo as amostras nestas condições mantidas em estufa a 60°C. O tempo total para realização desse processo foi contabilizado em 52 horas e 30 segundos (Figura 3).

[0055] Após a etapa da impregnação com parafina, as amostras foram incluídas em parafina líquida (60°C), no interior de moldes obtidos com auxílio de esquadros de Leuckart. A parafina líquida contida nesses moldes solidificou rapidamente e os blocos com as amostras de tecidos foram lapidados e conduzidos para a realização dos cortes em micrótomo de parafina. De cada bloco cortado foram obtidas finas fitas de cortes histológicos com 5 µm de espessura que foram estiradas sobre a superfície de água de um banho Maria com temperatura controlada (45°C) e posteriormente foram coletadas da água aquecida para lâminas de vidro previamente recobertas com a seiva da *Aloe vera* (planta conhecida como Babosa) para manter a adesividade e firmeza dos cortes obtidos.

[0056] Na etapa de pós-fixação (Figura 2), procedeu-se a desparafinização dos tecidos cortados, a coloração e a montagem das preparações histológicas. De acordo com o processamento convencional, as lâminas com os tecidos foram desparafinizadas em xilol I e II (permanecendo imersas em cada banho por 5 minutos). Posteriormente, foi procedido três banhos rápidos em uma mistura de álcool-xilol (por 30 segundos). Logo após, as amostras passaram por banhos (5 minutos cada) em álcoois com gradações decrescentes (100, 90, 80 e 70 %) e na sequência foram lavados em água corrente por um minuto. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), sendo, portanto, imersos em Hematoxilina (por dois minutos), em seguida lavados com água corrente por um minuto e novamente passaram por outra imersão em corante líquido (Eosina) por um minuto, sendo em seguida lavados com água corrente por um minuto. Os cortes corados seguiram para a fase de montagem, sendo rapidamente desidratados, por meio de banhos em álcoois (70, 80, 90 e 100 %, 5 minutos cada) e passaram, também, por uma mistura de álcool-xilol (um minuto), seguindo-se com banhos de 5 minutos cada, em xilol (I e II). A cobertura do tecido histológico corado foi finalizada com a deposição de uma gota de cola comercial (Entellan®) e foi realizada a colocação de uma lamínula por cima dessa cola, obtendo-se desta forma a preparação histológica permanente, que foi imediatamente observada por meio de microscópio de luz para a análise histológica. O tempo total para realização desse processo foi contabilizado em 67 minutos e 30 segundos (Figura 3).

[0057] No mesmo contexto da fase de pós-fixação (Figura 2), os tecidos cortados obtidos a partir do processo histológico atóxico (com uso do óleo mineral em substituição ao xilol), foram desparafinizados, colorados e montados gerando as preparações histológicas. As lâminas com os cortes de tecidos foram desparafinizadas por 10 minutos em recipiente contendo óleo mineral, dentro de uma estufa a 60 °C. Foi procedida uma rápida secagem de cada corte histológico por 10 segundos com papel de filtro. Em seguida, os referidos cortes passaram por banhos de 30 segundos cada, em álcoois com gradações decrescentes (100, 90, 80 e 70 %) e na sequência foram lavados em água corrente por um minuto. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), sendo inicialmente imersos em Hematoxilina (por 120 segundos), em seguida foram lavados com água corrente (30 segundos) e novamente passaram por outra imersão em corante líquido, Eosina (por 60 segundos) e mais uma vez, foram lavados com água corrente (30 segundos). Os cortes corados seguiram para a fase de montagem, sendo rapidamente desidratados, por meio de banhos em álcoois (70, 80, 90 e 100 %, 30 segundos cada) e em seguida secos em papel de filtro por 60 segundos. A cobertura do tecido histológico corado foi finalizada com a deposição de uma gota de cola natural (solução obtida da mistura do óleo mineral com o látex de *Artocarpus heterophyllus* Lam., Jaqueira) e foi realizada a colocação de uma lamínula por cima dessa cola, obtendo-se desta forma a preparação histológica permanente, que foi imediatamente observada por meio de microscópio de luz para a análise histológica. O tempo total para realização desse processo foi contabilizado em 19 minutos e 40 segundos (Figura 3).

Exemplos de concretizações da invenção

[0058] O tempo de processo reduzido obtido com o uso do óleo mineral em substituição ao xilol influenciou no grau de compactação dos tecidos, simplificando e acelerando a técnica histológica de rotina, com manutenção da arquitetura dos tecidos sem comprometer o diagnóstico. Além do que, a implantação desse processo foi capaz de garantir menor exposição do histotecnologista a produtos altamente tóxicos, propiciando biossegurança para o laboratorista, assim como para o meio ambiente.

[0059] Devido à grande toxicidade inerente ao ambiente no qual o histotecnologista está exposto diariamente, modificações metodológicas vêm sendo realizadas para excluir o xilol da rotina de processamento dos tecidos histológicos. Com a introdução do óleo mineral no processamento histológico, reduziu-se consideravelmente o tempo das etapas de diafanização e de desparafinização dos tecidos, realizadas antes do processo

de coloração, gerando um conjunto de benefícios tais como baixo custo, fácil exequibilidade e biossegurança.

[0060] O tempo total para realização das etapas de fixação e pré-fixação com o uso do óleo mineral foi contabilizado em 52 horas e 30 segundos e para a etapa de pós-fixação (desparafinização a 50°C, coloração e montagem) foi de 19 minutos e 40 segundos. O tempo da desparafinização foi consideravelmente reduzido, assim como foi menor a quantidade de álcool utilizada para a realização do referido processo. Os resultados foram satisfatórios e abrangeram diferentes critérios de avaliação (clareza e uniformidade da coloração, nitidez, adequação da coloração nuclear e citoplasmática, integridade das estruturas e adequação para avaliação histológica).

[0061] Em um estudo realizado por Premalatha et al. (2013) foi registrado o uso de óleo mineral refinado como agente desparafinizador em temperatura elevada (90°C) por 45 minutos, seguido de banhos em água destilada; o que resultou em substancial decaimento das marcações nuclear e citoplasmática.

[0062] Alwahaibi et al. (2018) propuseram como alternativa ao xilol, o uso do UltraClear™, um produto à base de isoparafina incolor e inodoro, contendo hidrocarbonetos (C11-12) derivados do fracionamento e craqueamento de petróleo bruto; embora considerado menos tóxico e menos inflamável, o custo foi duas vezes maior em comparação com o xilol, tendo sido apenas testado como agente de limpeza e não durante a desparafinização e coloração.

[0063] Yadav et al. (2019) analisaram uma solução aquosa de sabão de lavar louça a 1,7% (DWS) e óleo mineral refinado como agentes desparafinizadores em substituição ao xilol, e referiram para o 1,7% (DWS) resultados satisfatórios em função de alguns critérios como coloração citoplasmática, clareza e nitidez, havendo necessidade de mais investigações.

[0064] Num estudo recente realizado por PREMA et al. (2020) foram demonstrados diferentes tempos de processamento de alguns agentes proposto como desparafinizantes, o sabão de lavar louça a 1,7% (tempo requerido: 30 a 45 minutos), a água de limão (54 minutos) e 100% de óleo de coco (45 minutos).

[0065] O óleo mineral utilizado neste trabalho, constou de um hidrocarboneto não perigoso, alifático, incolor, inodoro, produzido a partir de destilados de petróleo. O uso

de óleo mineral no processamento histológico revelou-se vantajoso devido a sua capacidade de dissolução completa na parafina, possibilitando que o processo de desparafinação fosse realizado em menor tempo quando comparado à técnica convencional.

[0066] Outra vantagem técnica foi com relação à densidade do óleo mineral ser parecida com a densidade da gordura humana, o que possibilitou uma rápida remoção dessa gordura com a penetração do óleo e mesmo com essa substituição foi mantida a arquitetura dos tecidos do organismo para o estudo histológico. Em função do exposto, preconizou-se que o uso reduzido de etanol no processamento, o que favoreceu ainda mais na redução de custos para a realização do método.

[0067] O descarte do óleo mineral e suas misturas podem ser iniciados com uma filtração para retirada de partículas sólidas de parafinas que tenham ficado na mistura. O óleo pode passar por filtros de malha para eliminar as partículas remanescentes e no final, obtêm-se um óleo básico mineral rerrefinado com as mesmas características de óleo básico virgem.

[0068] Não há limites de tolerância quanto à exposição ao óleo mineral, não existindo necessidade de uso de equipamentos de proteção individual por profissionais da área (histotecnologistas), o que configura um processamento atóxico.

[0069] Equipamentos como histotécnicos automatizados têm sido preconizados para setores com grande volume de amostras a serem processadas; todavia ainda funcionam utilizando álcool, xilol e parafina em grande quantidade. Propostas de novos histotécnicos poderão surgir a partir da consolidação do uso do óleo mineral no processo histológico.

[0070] No intuito de manter o uso do óleo mineral em todo o processo histológico caracterizado como atóxico, a utilização de colas naturais na montagem das preparações histológicas foi de fundamental importância; uma vez que, as colas comerciais comumente utilizadas nos laboratórios de histotécnica possuem em sua composição solventes aromáticos. Sendo assim, meios de montagem naturais obtidos a partir de exsudatos naturais de plantas do Nordeste brasileiro têm sido considerados economicamente viáveis e ambientalmente saudáveis, por não serem dissolvidos em solventes químicos como ocorre com as colas comerciais usadas na rotina da técnica histológica.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO E COM TEMPO REDUZIDO **caracterizado por** uso de óleo mineral ao invés do xilol para rotina de laboratório de histotécnica.
2. PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** tempo reduzido nas etapas de diafanização e de desparafinização das amostras biológicas com o uso de óleo mineral ao invés do xilol.
3. PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** promover biossegurança para o histotecnologista e o ambiental visto não existir limites de tolerância quanto à exposição ao óleo mineral.
4. PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** garantir qualidade e durabilidade do material processado com o uso de óleo mineral ao invés do xilol.
5. PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizado por** capacitar o histotecnologista para o uso de óleo mineral ao invés do xilol, com ênfase nos benefícios gerados.

DESENHOS

PROCESSAMENTO DE TECIDOS HISTOLÓGICOS			
ETAPA DE PRÉ-FIXAÇÃO			
XILOL	<i>Tempo</i>	ÓLEO MINERAL	<i>Tempo</i>
Formol tamponado (10 %)	24 h	Formol tamponado (10 %)	24 h
Água corrente	30 seg	Água corrente	30 seg
ETAPA DE FIXAÇÃO PROPRIAMENTE DITA			
XILOL	<i>Tempo</i>	ÓLEO MINERAL	<i>Tempo</i>
Álcool 70%	24 h	Álcool 70%	24 h
Álcool 80%	1h	Álcool 80%	30 min (estufa 50°C)
Álcool 90%	1h	Álcool 90%	30 min (estufa 50°C)
Álcool 100%	1h	Álcool 100%	30 min (estufa 50°C)
Álcool 100%	1h	Álcool 100%	30 min (estufa 50°C)
Álcool-xilol	1h	Óleo mineral I	30 min (estufa 50°C)
Xilol I	1h	Óleo mineral II	30 min (estufa 50°C)
Xilol II	1h	Parafina I	30 min (estufa 60°C)
Parafina I	1h	Parafina II	30 min (estufa 60°C)
Parafina II	1h	-----	-----
Tempo total do processo:	57 horas e 30 segundos	Tempo total do processo:	52 horas e 30 segundos

Figura 1

PROCESSAMENTO DE TECIDOS HISTOLÓGICOS			
ETAPA DE PÓS-FIXAÇÃO			
(DESPARAFINIZAÇÃO/COLORAÇÃO/MONTAGEM)			
XILOL	<i>Tempo</i>	ÓLEO MINERAL	<i>Tempo</i>
Desparafinização		Desparafinização	
Xilo I	5 min	Óleo mineral na estufa	10 min
Xilol II	5 min	Secagem	10 seg
Álcool-xilol (03 banhos)	30 seg	Álcool 100% (03 banhos)	30 seg (estufa 50°C)
Álcool 100%	5 min	Álcool 90% (03 banhos)	30 seg (estufa 50°C)
Álcool 90%	5 min	Álcool 80% (03 banhos)	30 seg (estufa 50°C)
Álcool 80%	5 min	Álcool 70% (03 banhos)	30 seg (estufa 50°C)
Álcool 70%	5 min	Água corrente	30 seg
Água corrente	1 min	-----	-----
Coloração		Coloração	
Hematoxilina	2 min	Hematoxilina	120 seg
Água corrente	1 min	Água corrente	30 seg
Eosina	1 min	Eosina	60 seg
Água corrente	1 min	Água corrente	30 seg
Montagem		Montagem	
Álcool 70%	5 min	Álcool 70%	30 seg
Álcool 80%	5 min	Álcool 80%	30 seg
Álcool 90%	5 min	Álcool 90%	30 seg
Álcool 100%	5 min	Álcool 100%	30 seg
Álcool-Xilol	1 min	Secagem	60 seg
Xilol I	5 min	Cobertura com cola natural (mistura do óleo mineral com látex de <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam., Jaqueira)	-----
Xilol II	5 min	-----	-----
Cobertura com cola comercial (Entellan®)	-----	-----	-----
Tempo total do processo:	67 minutos e 30 seg	Tempo total do processo:	19 minutos e 40 seg

Figura 2



Figura 3

RESUMO**PROCESSO HISTOLÓGICO ATÓXICO E COM TEMPO REDUZIDO UTILIZANDO
ÓLEO MINERAL**

A produção diária de um Laboratório de Histotecnologia está voltada para o processamento de tecidos do organismo (humano ou animal) e até mesmo de amostras de plantas (folhas, caule ou raízes), usualmente corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) ou com outras técnicas de colorações especiais. Nos dias atuais, a realização do processamento histológico de rotina ainda expõe os técnicos e pesquisadores da área, a um produto tóxico e bastante conhecido, o Xilol. Devido à toxicidade inerente ao xilol, com riscos para a saúde humana e ao meio ambiente, modificações metodológicas vêm sendo realizadas mundialmente para a retirada desse produto ou para minimizar ao máximo a sua utilização na rotina dos Laboratórios de Histotécnica. A busca por um substituto seguro continua sendo uma necessidade diária, especialmente para a biossegurança do histotecnologista. No presente processo inventivo propõe-se um processo histológico atóxico e com tempo reduzido utilizando óleo mineral para a rotina de laboratórios de histotécnica das áreas de ensino, pesquisa e diagnóstico.